

Aus dem Zentrallabor (leitd. Arzt Professor Dr.
Karl Bartmann) der Städtischen Klinik für
Lungenkranke in Heckeshorn, 1 Berlin 39.
Am Großen Wannsee 80
(Direktor: Prof. Dr. K. L. Radenbach)

Untersuchungen über den Wirkungstyp von Tetracyclin

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Joachim Oertel
aus Coswig Bez. Dresden

1967

Aus dem Zentrallabor (leidt. Arzt Professor Dr.
Karl Bartmann) der Städtischen Klinik für
Lungenkranke in Heckeshorn, 1 Berlin 39.
Am Großen Wannsee 80
(Direktor: Prof. Dr. K. L. Radenbach)

Untersuchungen über den Wirkungstyp von Tetracyclin

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Joachim Oertel
aus Coswig Bez. Dresden

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang S p i e r
Referent: Professor Dr. med. Karl B a r t m a n n
Korreferent: Professor Dr. med. Hans H e r k e n



Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am:

27. NOV. 1967

Diese Arbeit widme ich meiner Frau Barbara



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 1 - 3
2. Methodik	Seite 4 - 10
2.1 Herkunft der untersuchten Bakterien- stämme	
2.2 Bestimmung der Hemmtiter	
2.3 Keimzählungskurven	
3. Ergebnisse	Seite 11 - 15
3.1 Bestimmung der Hemmtiter	
3.2 Keimzählungskurven	
4. Mathematische Bearbeitung der Ergebnisse	Seite 16 - 20
4.1 Analyse der Hemmtiterbestimmungen	
4.2 Analyse der Keimzählungskurven	
5. Diskussion	Seite 21 - 26
6. Zusammenfassung	Seite 27 - 28
Literatur	Seite 29 - 30

1. Einleitung

Die meisten Lehrbücher und einschlägigen Monographien (WALTER und HEILMEYER¹, KUSCHINSKY und LÜLLMANN², HAUSCHILD³) geben an, daß die Tetracycline vorwiegend bakteriostatisch wirken. Unveröffentlichte Beobachtungen von BARTMANN über die abtötende Wirkung geringer Tetracyclinkonzentrationen bei *H. influenzae* waren der Anlaß, diese Angaben zu überprüfen. Außerdem finden sich in der Literatur Angaben über einen abtötenden Effekt von Tetracyclin (TC).

HOBBY⁴ untersuchte den Wirkungstyp des Terramycin (Oxytetracyclin). Sie stellte fest, daß es auf sensible Bakterien abtötend wirkt, wenn die initiale Keimzahl niedrig ist. Bei höherer Einsaat war der abtötende Effekt vermindert oder es trat nur eine bakteriostatische Wirkung auf. Untersucht wurde je ein Stamm von *Streptococcus haemolyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. typhosa* und *Pseudomonas aeruginosa*.

KLEIN⁵ beobachtete für Terramycin bei einem Viridansstamm den Einfluß verschiedener Faktoren auf die vermehrungshemmende und abtötende Wirkung. Dabei zeigte sich, daß durch Verminderung der Keimzahl, Beschleunigung der Proliferation oder durch Zusatz von Pepton zur Nährbouillon der abtötende Effekt verstärkt wird. Die vermehrungshemmende Wirkung wird durch die gleichen Faktoren herabgesetzt.

KLEIN folgerte daraus, daß die Bakterienzelle zwei verschiedene Rezeptoren für die vermehrungshemmende und die abtötende Wirkung des Terramycins besitzen müsse.

1953 erhielten BOOTH⁶ und Mitarb. bzw. CONOVER und Mitarb.⁷ bei der katalytischen Hydrierung des Chlortetracyclins das chlorfreie TC. Im gleichen Jahr konnten MINIERI und Mitarb.⁸ aus Fermentationsprodukten einer *Streptomyces*-art aus Texas das TC isolieren, welches mit dem halbsynthetisch gewonnenen identisch war. Die antibakterielle Wirkung wurde von WELCH und Mitarb.⁹ und REEDY und Mitarb.¹⁰ im Reihenverdünnungstest untersucht. Es zeigte sich, daß TC gegen grampositive und gramnegative Bakterien wirksam ist.

Proteus vulgaris und *Pseudomonas aeruginosa* waren nur wenig empfindlich.

Wie schon erwähnt, wird die Wirkung des TC meist als bakteriostatisch bezeichnet. In der Literatur sind aber auch Angaben über eine abtötende Wirkung zu finden. HAMBURGER und CARLETON¹¹ erhielten bei einer hohen Einsaat von 10^7 Keimen/ml eine langsam abtötende Wirkung des TC gegenüber Staphylokokken, die nach mehreren Tagen zu einer Sterilisation führte. Die gleichen Autoren¹² stellten fest, daß die abtötende Wirkung des TC bei Staphylokokken umso größer ist, je höher die TC-Konzentration und je geringer das Inoculum ist. KNOTHE und Mitarb.¹³ teilten mit, daß höhere TC-Konzentrationen von 25mcg/ml Keimreduktionen um 1 - 2 Zehnerpotenzen bei Staphylokokken im abgewandelten Röhrchentest bewirken. RITZERFELD¹⁴ prüfte mit der WARBURG-Methode und durch Keimzählungen Pyrrolidino-methyl-tetracyclin gegenüber *Staphylococcus aureus* hämolyticus. Es zeigte sich, daß die mit diesem TC-Derivat erreichbaren kurzfristigen Blutspiegel von 25 und 50mcg/ml nach kurzer Zeit eine abtötende Wirkung erreichen. Durch 10mcg/ml wird nach längerer Einwirkungszeit ein Teil der Bakterienpopulation abgetötet.

Die bisher veröffentlichten Befunde über den Effekt von TC auf die Vitalität der Erreger sind also uneinheitlich. Die Ursachen für diese Differenzen sind zur Zeit unbekannt. Sie könnten z.T. methodisch bedingt sein. Außerdem wurde oft nur ein Stamm untersucht. Es ist daher an Stammes- und Speziesunterschiede zu denken. Ferner lassen die bisherigen Ergebnisse nicht erkennen, ob die beobachteten Keimreduktionen zu der Annahme berechtigen, daß ein bakterizider Wirkungstyp vorliegt.

HIRSCH¹⁵ hat 1945 beschrieben, daß Penicillin nur aktiv stoffwechselnde Keime abtötet und daß hierbei ganz charakteristische Absterbekurven erhalten werden. Er hat diese Kurven als Folge eines degenerativen Wirkungstypes inter-

pretiert und von dem echt bakteriziden Wirkungstyp, wie er z.B. den Desinfektionsmitteln eigen ist, abgetrennt. Untersuchungen¹⁶⁻²¹ über die chemischen Grundlagen der Penicillinwirkung haben die Auffassungen von HIRSCH bestätigt. Inzwischen ist auch für andere Chemotherapeutika ein degenerativer Wirkungstyp nachgewiesen worden, u.a. für Streptomycin durch MITCHISON und SELKON²² und für Isoniazid durch BARTMANN²³. Wird eine Abtötung beobachtet, ist es daher erforderlich, sie nach ihrem Wirkungstyp zu differenzieren.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, mit einheitlicher Methodik die Wirkung von TC auf jeweils mehrere Stämme verschiedener Spezies zu untersuchen und im Falle eines abtötenden Effektes festzustellen, ob die Kinetik einem der bekannten Wirkungstypen entspricht. Zu diesem Zweck wurden Hemmtiterbestimmungen durchgeführt und Keimzählungskurven ermittelt.

2. Methodik

2.1 Herkunft der untersuchten Bakterienstämme

Die folgenden Stämme wurden freundlicherweise vom ROBERT-KOCH-Institut Berlin zur Verfügung gestellt:

- 4 Stämme *Salmonella typhosa*
- 4 Stämme *Shigella flexneri*
- 5 Stämme *Klebsiella pneumoniae*
- 6 Stämme *Dyspepsie-Coli*

Außerdem wurden Stämme verwendet, die im bakteriologischen Labor der Klinik für Lungenkranke Heckeshorn bei routinemäßigen Sputumuntersuchungen isoliert worden waren. Es handelt sich um:

- 5 Stämme *Staphylococcus aureus* hämolyticus
(Koagulase +)
- 5 Stämme *Enterococcus*
- 5 Stämme vergrünende Streptokokken.

Aus der Sammlung des Zentrallabors der Klinik für Lungenkranke Heckeshorn stammen die folgenden 4 Bakterienstämme:

- 1. *B. cereus*
- 2. *B. subtilis*
- 3. *B. megaterium*
- 4. *Staphylococcus aureus* hämolyticus Typ SG 511

Sämtliche Bakterienstämme befinden sich jetzt in der Sammlung des Zentrallabors der Klinik für Lungenkranke Heckeshorn. Während der Durchführung der Versuche für diese Arbeit wurden die Stämme auf Blutagarplatten gehalten.

2.2 Bestimmung der Hemmtiter

2.2.1 Prinzip:

Zur Bestimmung des bakteriostatischen Hemmtiters wurde eine bestimmte Anzahl Bakterien in mehrere Röhrchen gebracht, die jeweils außer einem Nährmedium eine TC-Lösung enthielten, deren Konzentration von Röhrchen zu Röhrchen zunahm. Nach 24 und 48 Std. Bebrütung wurde die niedrigste TC-Konzentration festgestellt, die eine makroskopisch sichtbare Trübung des Nährmediums verhinderte. Zur Bestimmung

der bakteriziden Hemmtiter wurde aus den Röhrchen, in denen keine makroskopisch sichtbare Trübung beobachtet worden war, eine Probe entnommen und in TC-freiem Nährmedium 48 Std. bebrütet. Nach 24 und 48 Stunden wurde festgestellt, in welchem Röhrchen keine makroskopisch sichtbare Trübung der Subkultur zu beobachten war. Die entsprechende TC-Konzentration wurde als bakterizider Hemmtiter bezeichnet. Es muß schon hier betont werden, daß die Bezeichnung dieser Hemmtiter als "bakterizid" nicht mit der Bezeichnung echt "bakterizider Wirkungstyp" identisch ist.

Um die Reproduzierbarkeit der Titerbestimmungen zu gewährleisten, wurden folgende Versuchsbedingungen standardisiert:

- Einsaat,
- Alter der Kultur,
- Zusammensetzung des Nährmediums,
- pH-Wert,
- Bebrütungstemperatur,
- Bebrütungsdauer.

2.2.2 Einstellung der Keimzahl:

Zur Herstellung einer bestimmten Keimzahl wurden die Keime in Herz-Hirn-Bouillon (Difco, 3,7%, pH=7,4) 24 Std. bei 37°C im Brutschrank vorgezüchtet. Durch Trübungsmessungen im Riele-Photometer wurde die Keimzahl dieser Kultur festgestellt. Dabei wurde der Nullpunkt des Photometers bei einer Wellenlänge von 520m μ (Filter 4) auf eine Vergleichslösung aus reiner Herz-Hirn-Bouillon eingestellt. Die Absorption der durch Vorzüchtung getrübbten Kultur wurde bestimmt und aus einer Eichkurve die Keimzahl abgelesen. Die Einsaat sollte 2×10^3 Keime/ml ($=10^4$ Keime pro 5 ml Gesamtvolumen in einem Röhrchen) betragen. Diese Keimzahl wurde gewählt, weil sie einerseits groß genug ist, um das durchschnittliche Verhalten der Bakterienpopulation zu repräsentieren. Andererseits ist sie so klein, daß sie mit großer Wahrscheinlichkeit keine primär resistenten Mutanten enthält, welche das typische Verhalten der Keimpopulation verschleiern

würden. 1ml der vorgezüchteten Kultur wurde mit Herz-Hirn-Bouillon auf 10^6 Keime/ml verdünnt. Aus dieser Bouillon wurde mit geeichter Öse 0,01ml in jedes Röhrchen der TC-Verdünnungsreihe gebracht. Die Einsaat wurde bei jeder Verdünnungsreihe kulturell kontrolliert. Es wurde jeweils eine Probe auf Blutagarplatten ausgestrichen und die Anzahl der Einzelkolonien nach 24 Std. Bebrütung festgestellt.

2.2.3 TC-Verdünnungsreihe:

Eine Reihe von Reagenzgläsern enthielt jeweils 4ml Herz-Hirn-Bouillon (Difco, 3,7%, pH=7,4) und 1ml einer Lösung von TC (Hostacyclin^R Hoechst für Testzwecke) in Aqua dest. Die TC-Konzentrationen nahmen von Röhrchen zu Röhrchen zu. Dabei wurden die Unterschiede zwischen zwei aufeinanderfolgenden Röhrchen wie folgt gewählt: zwischen 0,1 und 1,0mcg/ml alle 0,2mcg/ml, zwischen 1 und 10mcg/ml alle 1mcg/ml, zwischen 10 und 100mcg/ml alle 10mcg/ml. Die TC-Lösungen wurden bei jeder Versuchsreihe durch Auflösen der Trockensubstanz in Aqua dest. frisch hergestellt. Die Verdünnungsreihe wurde bei 37°C bebrütet. Nach 24 und 48 Std. wurde abgelesen, in welchem Röhrchen noch keine makroskopisch sichtbare Trübung festzustellen war. Die entsprechende TC-Konzentration wurde als bakteriostatischer 24- und 48-Std.Hemmtiter bezeichnet. Zur Kontrolle wurde bei jeder Verdünnungsreihe ein Röhrchen ohne TC-Zusatz mitgeführt. Außerdem wurde jeweils eine TC-Verdünnungsreihe mit dem Teststamm Staphylococcus aureus hämolyticus SG 511 beschickt, dessen Hemmtiter bekannt war und der daher zur Kontrolle der Antibiotikakonzentration diente. Der bakteriostatische Hemmtiter gibt die TC-Konzentration an, die nach 24 bzw. 48 Std. Bebrütung eine Keimzahlvermehrung um nicht mehr als 4 Zehnerpotenzen zuläßt. Die Keimzahl kann theoretisch von 2×10^3 Keime/ml bei der Einsaat auf etwas weniger als 10^7 Keime/ml ansteigen,

bevor eine Trübung sichtbar wird. Um die bakteriziden Titer zu bestimmen, wurden nach 24 und 48 Std. aus den Röhrchen der Verdünnungsreihe, die keine sichtbare Trübung zeigten, mit der geeichten Öse 0,01ml entnommen und in jeweils 5ml Herz-Hirn-Bouillon übertragen. Nach 24 und 48 Std. Bebrütung wurde abgelesen, in welchem Röhrchen der Reihe keine sichtbare Trübung aufgetreten war. Dieses Röhrchen zeigte den bakteriziden Hemmtiter an. Das ist die TC-Konzentration, welche nach 24 bzw. 48 Std. Bebrütung ein Absterben (irreversible Vermehrungshemmung) von etwa 95% der Bakterienpopulation bewirkt hat. Die Keimzahl mußte von 2×10^3 Keime/ml bei der Einsaat auf weniger als 10^2 Keime/ml vermindert worden sein. Bei Entnahme von 0,01ml kann nämlich dann kein Keim mehr übertragen werden, wenn in der Primärkultur weniger als 100 Keime/ml vorhanden sind, d.h. 5% der anfangs vorhandenen Bakterienpopulation. Hierbei wurde angenommen, daß ein einziger übertragener Keim ausreicht, um nach 24 bzw. 48 Std. Bebrütung das Wachstumsmedium zu trüben. Zur Kontrolle wurde von den Subkulturröhrchen mit sichtbarer Trübung ein mikroskopisches Präparat angefertigt, um Verunreinigungen durch andere Bakterien auszuschließen. Bei den Typhus-, Dyspepsiecoli- und Ruhrstämmen wurde außerdem durch Agglutination mit entsprechenden Seren ihre Identität geprüft. Bei der Bestimmung der bakteriziden Titer bestand die Möglichkeit, daß durch Übertragung von TC aus der Primärkultur in die Subkultur das Ergebnis beeinflußt wurde. Um dies auszuschalten, wurde bei einigen Bakterienstämmen ein besonderes Verfahren angewendet. Dabei wurden nach 24 und 48 Std. die nicht getrüben Röhrchen der Primärkultur zentrifugiert, die Bouillon bis auf einen Rest von 0,5ml ab-

gesaugt und auf 5ml Gesamtvolumen mit 0,9% NaCl-Lösung aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde dann nochmals wiederholt und zuletzt mit Bouillon auf 5ml aufgefüllt. Nach 24 und 48 Std. Bebrütung wurden die bakteriziden Titer abgelesen.

2.3 Keimzählungskurven

2.3.1 Prinzip:

Eine bestimmte Anzahl Keime einer Bakterienart wurde in ein Nährmedium ohne bzw. mit TC-Zusatz gebracht und bei 37°C zur Vermehrung gebracht. In bestimmten Abständen wurden der Kultur Proben entnommen und auf Blutagarplatten ausgestrichen. Unter der Voraussetzung, daß aus jedem Keim auf der Blutplatte eine makroskopisch sichtbare Einzelkolonie entsteht, wurde die Koloniezahl nach 24 und 48 Std. abgelesen und die Keimzahl berechnet.

2.3.2 Keimzählungskurven bei mittelfroßer Einsaat:

Die Einstellung der Keimzahl erfolgte nach der unter 2.2.2 beschriebenen Methode auf $4,5 \times 10^6$ Keime/ml Nährmedium. Mit der geeichten Öse wurden jeweils 0,01ml dieser Bakterienkultur in mehrere Reagenzgläser gebracht, die 4,5ml Herz-Hirn-Bouillon (Difco, 3,7%, pH=7,4) enthielten. Es ergab sich eine Keimzahl von 10^4 Keimen/ml Nährmedium. Die Reagenzgläser wurden in ein Wasserbad von 37°C gebracht. Nach 3 Std. wurden jedem Reagenzglas 0,5ml einer wäßrigen TC-Lösung zugesetzt, deren Konzentration von Röhrchen zu Röhrchen zunahm. Dabei wurden bei Staphylo- und Enterokokken die TC-Konzentrationen des bakteriostatischen und bakteriziden Hemmtiters, sowie das 12-, 40- und 100 fache des bakteriostatischen Titors verwendet. Bei Typhus- und Ruhrbakterien wurden die TC-Konzentration des bakteriostatischen Hemmtiters und das 4-, 12- und 40 fache dieser Konzentration zugegeben. Ein Röhrchen enthielt als Kontrolle nur 0,5ml Aqua dest. anstatt TC-Lösung. In allen Röhrchen wurde zu Beginn des Bakterienwachstums und danach in bestimmten Abständen die Keimzahl bestimmt. Dazu wurde mit einer sterilen

Pipette jeweils 0,1ml der sich vermehrenden Bakterienkultur entnommen und mit 0,9ml einer 0,9% NaCl-Lösung verdünnt. Von dieser Bakteriensuspension wurde mit einer geeichten Öse mehrmals jeweils 0,01ml auf Blutagarplatten so vollständig wie möglich ausgestrichen. Nach 24 und 48 Std. Bebrütung bei 37°C wurden die Einzelkolonien auf der Blutagarplatte gezählt. Ergaben sich keine Einzelkolonien wurde der Versuch mit zusätzlichen Verdünnungstufen der entnommenen Proben wiederholt. Der Mittelwert der kulturellen Keimzahl wurde meist aus 4 Einzelausimpfungen ermittelt. Bei zeitlich eng aufeinanderfolgenden Ausimpfungen wurden 2 oder 3 Einzelwerte bestimmt.

2.3.3 Keimzahlungskurven bei hoher Einsaat:

Bei diesen Versuchen wurde die Keimzahl mittels der unter 2.2.2 beschriebenen Methode so eingestellt, daß nach der Einsaat in die Bouillon etwa 10^7 Keime/ml enthalten waren. Die TC-Lösungen wurden nach 2 Std. zugesetzt.

2.3.4 Keimzahlungskurven bei ruhenden Keimen:

Bei diesen Untersuchungen wurde die Keimzahl wie unter 2.3.2 auf $4,5 \times 10^6$ Keime/ml eingestellt, sodaß sich nach der Einsaat etwa 10^4 Keime/ml ergaben. Um das Wachstum der Keime zu unterbinden, wurden die Versuche in einer Elektrolytlösung ohne Stickstoffquelle durchgeführt. Vor Zusatz des TC wurden die Keime außerdem 2 Std. bei 37°C ausgehungert. Die Elektrolytlösung hatte folgende Zusammensetzung:

Magn. chlorat.	0,0005g
Natr. phosphor.	0,001g
Kal. chlorat.	0,04g
Natr. chlorat.	0,8g
Sacch. amylac.	0,11g
Natr. bicarb.	0,025g
Calc. chlorat.	0,025g
Aqua bidest. ad	100,0ml

Nur in dieser Lösung war es möglich, das natürliche Absterben der Keime über einige Stunden zu verhindern. Vorversuche

hatten gezeigt, daß die angegebenen Bakterienstämme in 0,9%iger NaCl-Lösung und in äquilibrierter Lösung nach DUBOS sehr schnell absterben.

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Hemmtiter

Tab. Ia und b zeigen die bakteriostatischen und bakteriziden Hemmtiter bei 38 untersuchten Bakterienstämmen. Dabei wurden die bakteriziden Titer ohne Zentrifugieren und Auswaschen bestimmt.

Die bakteriostatischen Hemmtiter wiesen nach 24 Std. Bebrütung einen arithmetischen Durchschnitt von 0,57mcg/ml (Medianwert 0,6mcg/ml) auf und schwankten zwischen 0,04mcg/ml bei einem Sporenbildner und 2mcg/ml bei einem Stamm von *Klebsiella pneumoniae*. Sie lagen also fast ausnahmslos im Bereich guter Empfindlichkeit, d.h. $\approx$ 1mcg/ml. Es zeichneten sich zwei Gruppen von Keimen ab. Die eine hatte mit 0,27mcg/ml im Durchschnitt (Medianwert 0,2mcg/ml) niedrige Hemmtiter. Zu ihr gehören Staphylo-, Entero- und vergärende Streptokokken und Sporenbildner (mit Ausnahme von *B. megaterium*). Die andere Gruppe hatte höhere Hemmtiter mit 0,85mcg/ml im Durchschnitt (Medianwert 0,8mcg/ml). Zu ihr gehören Typhus-, Ruhr-, *Klebsiella*- und *Dyspepsiecoli*-Bakterien. Der Unterschied zwischen beiden Durchschnitten war bei Prüfung mit der t-Verteilung von Student statistisch signifikant, da der Wert $t = 7,735$ außerhalb der Sicherheitsgrenze lag ($t = 3,592$ bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von 0,001). Bei 48 Std. Bebrütung waren die bakteriostatischen Hemmtiter gleich oder um 1 - 2 Stufen höher als nach 24 Std. Die höheren Hemmtiter nach 48 Std. wiesen daraufhin, daß der bakteriostatische 24 Std.-Hemmtiter nur über 24 Std. das Heranwachsen der Kultur bis zur Grenze der sichtbaren Trübung verhindern kann. Für 48 Std. sind höhere Konzentrationen nötig.

Die bakteriziden Hemmtiter waren sehr unterschiedlich bei den untersuchten Bakterienarten. Sie lagen bei 24 Std. Bebrütung der nach 24 Std. abgenommenen Subkultur bei Staphylo-, Entero- und vergärenden Streptokokken und bei den Sporenbildnern (mit Ausnahme von *B. megaterium*) im Durchschnitt bei 0,60mcg/ml. Bei Typhus-, Ruhr-, *Klebsiella*- und Dys-

Tab. Ia Bakteriostatische und bakterizide Hemmtiter

Bakterienstamm	bakteriostat. Hemmtiter		bakterizide Hemmtiter			
	Bebrütung 24Std. 48Std.		Subkultur			
			n.24Std.		n.48Std.	
			Bebrütung 24Std. 48Std.		Bebrütung 24Std. 48Std.	
Staph. aureus	1.	0,2 0,4	0,8 0,8	1,0 1,0	0,6 0,6	0,6 0,6
	2.	0,2 0,4	0,4 0,4	0,6 0,6	0,6 0,6	0,6 0,6
	3.	0,2 0,4	0,6 0,6	0,6 0,6	0,6 0,6	0,6 0,6
	4.	0,2 0,4	1,0 1,0	0,6 0,6	0,6 0,6	0,6 0,6
	5.	0,2 0,4	0,4 0,4	0,6 0,6	0,6 0,6	0,6 0,6
	6.	0,2 0,4	0,4 0,4	0,8 0,8	0,6 0,6	0,6 0,6
Entero- coccus	1.	0,4 0,4	0,6 0,6	0,6 0,6	0,6 0,6	0,6 0,6
	2.	0,4 0,6	0,6 0,6	0,8 0,8	0,6 0,6	0,6 0,6
	3.	0,4 0,4	0,6 0,6	0,6 0,6	0,6 0,6	0,6 0,6
	4.	0,4 0,4	0,6 0,6	0,6 0,6	0,6 0,6	0,6 0,6
	5.	0,4 0,4	1,0 1,0	0,6 0,6	0,6 0,6	0,6 0,6
vergrünende Strepto- kokken	1.	0,1 0,2	0,2 0,2	0,4 0,4	0,6 0,6	0,6 0,6
	2.	0,4 0,6	0,8 2,0	1,0 2,0	0,6 0,6	0,6 0,6
	3.	0,2 0,6	0,6 0,6	1,0 1,0	0,6 0,6	0,6 0,6
	4.	0,4 0,8	1,0 1,0	0,8 0,8	0,6 0,6	0,6 0,6
	5.	0,4 0,6	1,0 2,0	1,0 1,0	0,6 0,6	0,6 0,6
Sporen- bildner	1.	0,04 0,06	0,06 0,06	0,06 0,06	0,06 0,06	0,06 0,06
	2.	0,2 0,2	0,2 0,2	0,2 0,2	0,2 0,2	0,2 0,2
	3.	0,8 2,0	20 20	20 20	20 20	20 20

Sporenbildner: 1. *B. cereus*
2. *B. subtilis*
3. *B. megaterium*

Tab. Ib Bakteriostatische und bakterizide Hemmtiter

Bakterienstamm		bakteriostat. Hemmtiter		bakterizide Hemmtiter			
		Bebrütung 24Std. 48Std.		Subkultur			
				n.24Std.		n.48Std.	
				Bebrütung 24Std. 48Std.		Bebrütung 24Std. 48Std.	
Salmonella typhosa	1.	0,6	2,0	50	50	20	30
	2.	0,6	0,8	20	20	20	20
	3.	0,8	2,0	50	50	40	40
	4.	1,0	2,0	40	40	50	50
Shigella flexneri	1.	0,8	2,0	60	80	40	40
	2.	0,8	2,0	80	80	80	80
	3.	0,8	2,0	90	100	60	60
	4.	0,8	1,0	60	60	40	40
Klebsiella pneumoniae	1.	0,6	1,0	3,0	3,0	2,0	2,0
	2.	0,8	2,0	50	50	40	40
	3.	0,8	2,0	40	40	40	40
	4.	1,0	2,0	50	50	40	40
	5.	2,0	3,0	100	100	100	100
Dyspepsie- Coli	1.	0,6	0,8	7,0	7,0	10	10
	2.	0,8	2,0	30	30	9,0	9,0
	3.	0,8	2,0	30	30	20	20
	4.	0,8	1,0	30	30	30	30
	5.	0,8	1,0	40	40	30	30
	6.	0,8	2,0	100	100	60	60

pepsiecoli-Bakterien betrugen sie im Durchschnitt 47,5mcg/ml. Bei den zuerst genannten Keimgruppen liegen also die bakteriostatischen und bakteriziden Hemmtiter sehr eng beieinander. Bei der zweiten Gruppe klaffen sie stark auseinander. Wurden die Subkulturen erst nach 48 Std. angelegt, so waren die Hemmtiter zum Teil gleich hoch. Bei den meisten gramnegativen Keimen waren die Hemmtiter nach 48 Std. niedriger. Dies deutet daraufhin, daß auch noch am 2. Tage eine Abtötung stattfindet. Wenn 48 Std. zur Verfügung stehen, so sind geringere TC-Konzentrationen nötig, um die Keimzahl bis zur Grenze der Züchtbarkeit in der Subkultur zu vermindern. Bei einigen grampositiven Keimen waren die 48 Std.-Hemmtiter etwas höher. Dies könnte ein Hinweis sein, daß die TC-Wirkung bei diesen Keimen nach 24 Std. nachläßt. Die wenigen nach 24 Std. nicht mehr in der Subkultur erfaßten Keime haben sich nach 48 Std. wieder bis zur Grenze der Nachweisbarkeit vermehrt. Es sind deshalb höhere TC-Konzentrationen nötig, um auch noch nach 48 Std. diese Keime zu hemmen. Die Bebrütung der Subkulturen für 48 statt 24 Std. ergab bei den meisten Stämmen keine unterschiedlichen bakteriziden Hemmtiter. Nur in einigen Fällen waren sie nach 48 Std. etwas höher als nach 24 Std.

Tab. II zeigt die bakteriziden Hemmtiter, die mit und ohne Auswaschen des in die Subkultur übertragenen TC bestimmt wurden. Das Auswaschen des TC wurde bei denjenigen Bakterienstämmen angewendet, bei denen die bakteriziden Titer hoch lagen, d.h. meist zwischen 20 und 100mcg/ml. Bei diesen Bakterienstämmen bestand am ehesten die Möglichkeit, daß wirksame TC-Konzentrationen in die Subkultur übertragen werden. Wie aus Tab. II hervorgeht, liegen die auf diesem Wege gewonnenen bakteriziden Hemmtiter teilweise unter und teilweise über den ohne Auswaschen ermittelten Werten. Die ohne Auswaschen bestimmten bakteriziden Hemmtiter können also als zuverlässig angesehen werden. Dies war auch zu erwarten, da bei einer Überimpfung von 0,01ml aus einer

Tab. II Bakterizide Hemmtiter, die mit und ohne Auswaschen des in die Subkultur übertragenen TC bestimmt wurden.

Bakterien- stamm	ohne Auswaschen des TC				mit Auswaschen des TC			
	Subkultur				Subkultur			
	n.24Std.		n.48Std.		n.24Std.		n.48Std.	
	Bebrütung 24Std. 48Std.		Bebrütung 24Std. 48Std.		Bebrütung 24Std. 48Std.		Bebrütung 24Std. 48Std.	
Staph. aureus	0,8	0,8	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0
B. megat.	20	20	20	20	30	30	20	20
Salmonella typhosa	50	50	20	30	10	20	40	50
	40	40	50	50	10	20	50	80
	50	50	40	40	10	20	40	60
	20	20	20	20	20	40	20	30
Shigella flexneri	60	80	40	40	20	40	40	60
	80	80	80	80	20	40	40	80
	90	100	60	60	20	20	40	80
	60	60	40	40	20	40	30	40
Dyspepsie- Coli	7	7	10	10	7	7	9	9
	30	30	9	9	50	50	50	50
	30	30	20	20	50	50	40	40
	30	30	30	30	40	50	40	50
	100	100	60	60	100	100	80	80
Klebsiella pneumoniae	50	50	40	40	30	50	40	60
	40	40	40	40	40	60	40	50
	100	100	100	100	80	100	60	100
	50	50	40	40	30	40	30	50
	3	3	2	2	4	8	2	2

Bouillon mit 100mcg/ml TC in 5ml medikamentfreie Bouillon das TC auf 0,2mcg/ml reduziert wird. Das ist eine Konzentration, die für die betreffenden Stämme nicht mehr vermehrungshemmend wirkt.

3.2 Keimzählungskurven

Bei 4 Bakterienstämmen wurden Keimzählungskurven mit einer Einsaat von 10^4 Keimen/ml angefertigt. Proliferierende Keime von *Staphylococcus aureus* hämolyticus Typ SG 511, *Enterococcus*, *Salmonella typhosa* und *Shigella flexneri* wurden steigenden TC-Konzentrationen ausgesetzt. Die Abb. 1a - d zeigen die Mittelwerte aus 4, seltener 3 oder 2 Einzelbestimmungen zu bestimmten Zeitpunkten nach Zusatz des TC. Bei niedriger TC-Konzentration wurde die Keimzahl, die bei Zugabe des TC bestand, nicht unterschritten. Bei höheren TC-Konzentrationen wurde die Ausgangskeimzahl unterschritten. Es besteht also bei niedriger TC-Konzentration eine vermehrungshemmende, bei höherer TC-Konzentration eine abtötende Wirkung.

Die Abb. 2a und b zeigen die Wirkung abgestufter TC-Konzentrationen auf proliferierende Keime von *Staphylococcus aureus* hämolyticus und *Enterococcus* bei einer auf 10^7 Keime/ml erhöhten Einsaat. Auch hier trat bei niedriger TC-Konzentration eine vermehrungshemmende und bei hoher TC-Konzentration eine abtötende Wirkung auf. Zur Erzielung des gleichen Effektes waren bei einer Einsaat von 10^7 Keimen/ml deutlich höhere Konzentrationen erforderlich.

Zur weiteren Klärung, ob ein bakterizider oder ein degenerativer Wirkungstyp vorliegt, wurden ruhende Keime von *Staphylococcus aureus* hämolyticus und *Shigella flexneri* steigenden TC-Konzentrationen ausgesetzt (Abb. 3a und b). In der angegebenen Elektrolytlösung kam es ohne TC-Zusatz nach wenigen Stunden zu einer Verminderung der Keimzahl infolge des natürlichen Absterbens der Keime bei Fehlen einer Stickstoffquelle. Durch Zusatz von TC wurde das natürliche Absterben bei den beiden untersuchten Bakterienstämmen verzögert. Die ruhenden Keime wurden also durch TC

ABB. 1a KEIMZÄHLUNGSKURVEN VON STAPHYLOCOCCUS AUREUS HÄMOLYTICUS

BEI MITTELGROSSEN EINSAAT

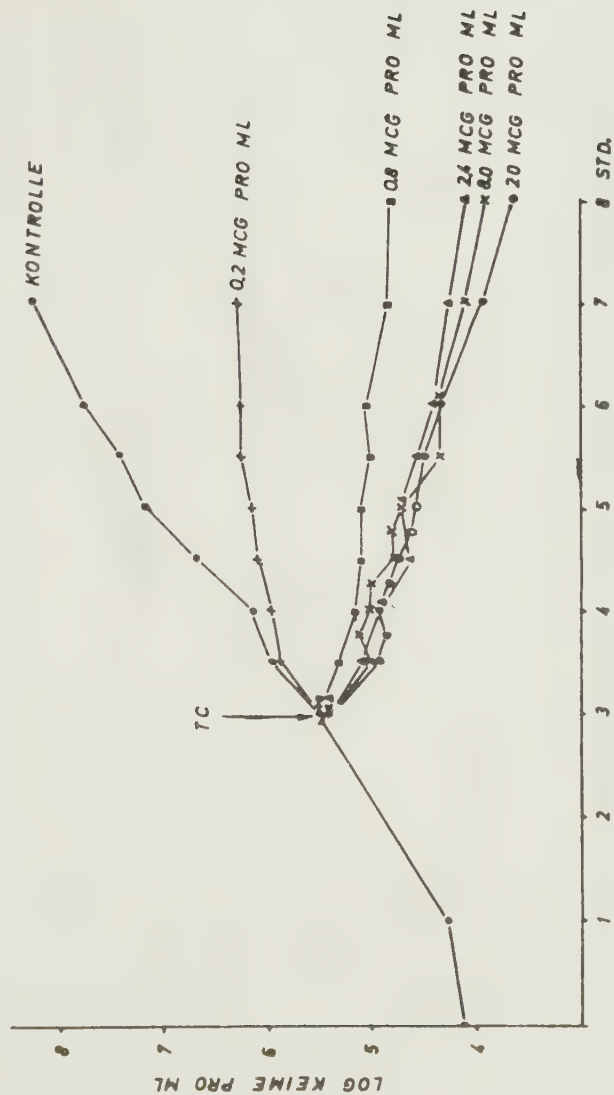
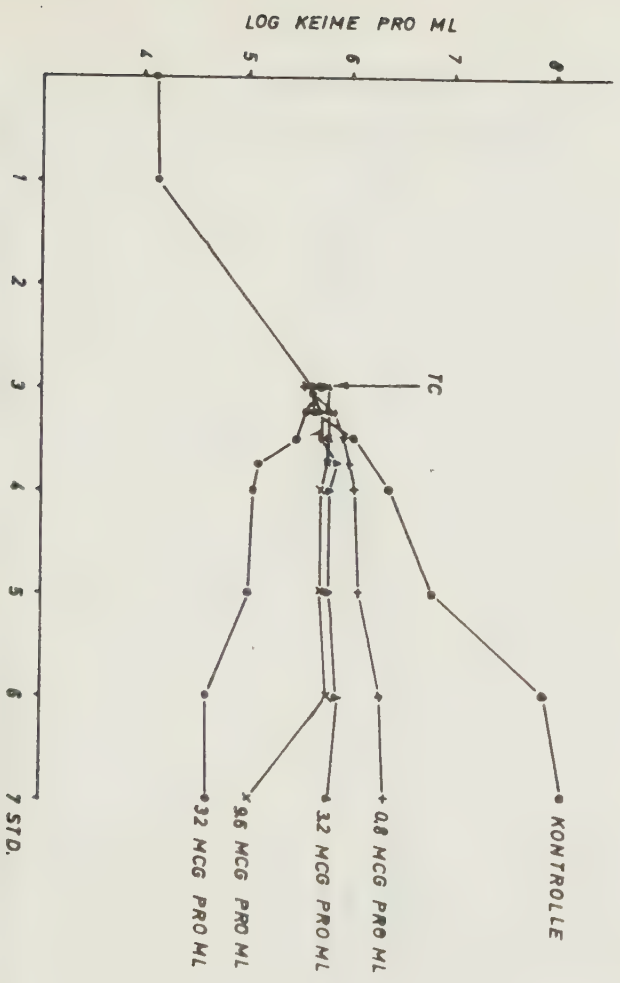


ABB.16 KEIMZÄHLUNGSKURVEN VON ENTEROCOCCUS BEI MITTELGROSSE EINSAAT



ABR.1c KEIMZÄHLUNGSKURVEN VON SALMONELLA TYPHOSA BEI MITTELGROSSEMER EINSAT



ABRID KEIMZÄHLUNGSKURVEN VON SHIGELLA FLEXNERI BEI MITTELGRÖßER EINSAAT

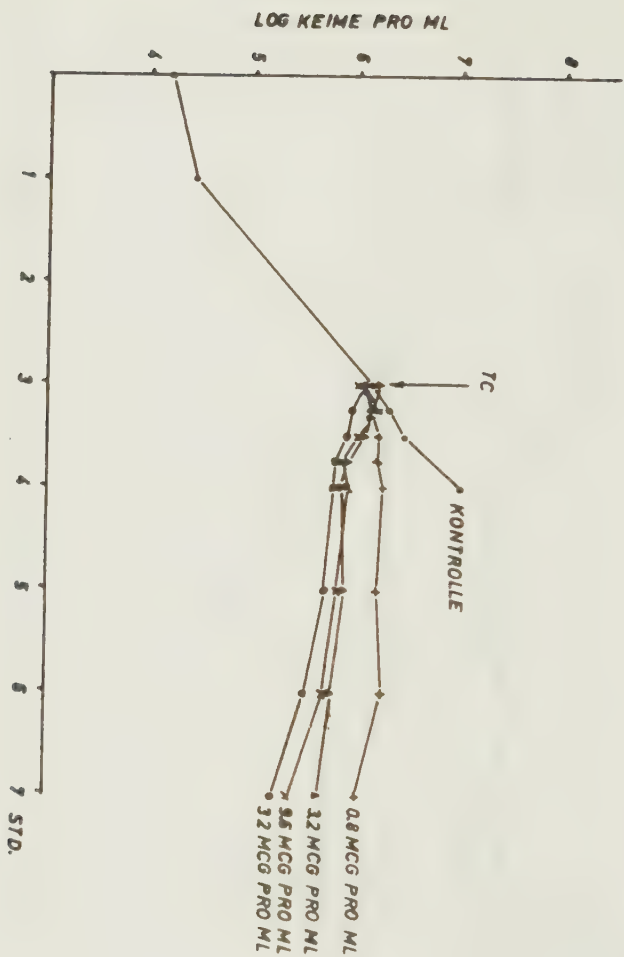


ABB. 21 KEIMZÄHLUNGSKURVEN VON STAPHYLOCOCCUS AUREUS HÄMOLYTICUS BEI HOHER EINSAAT

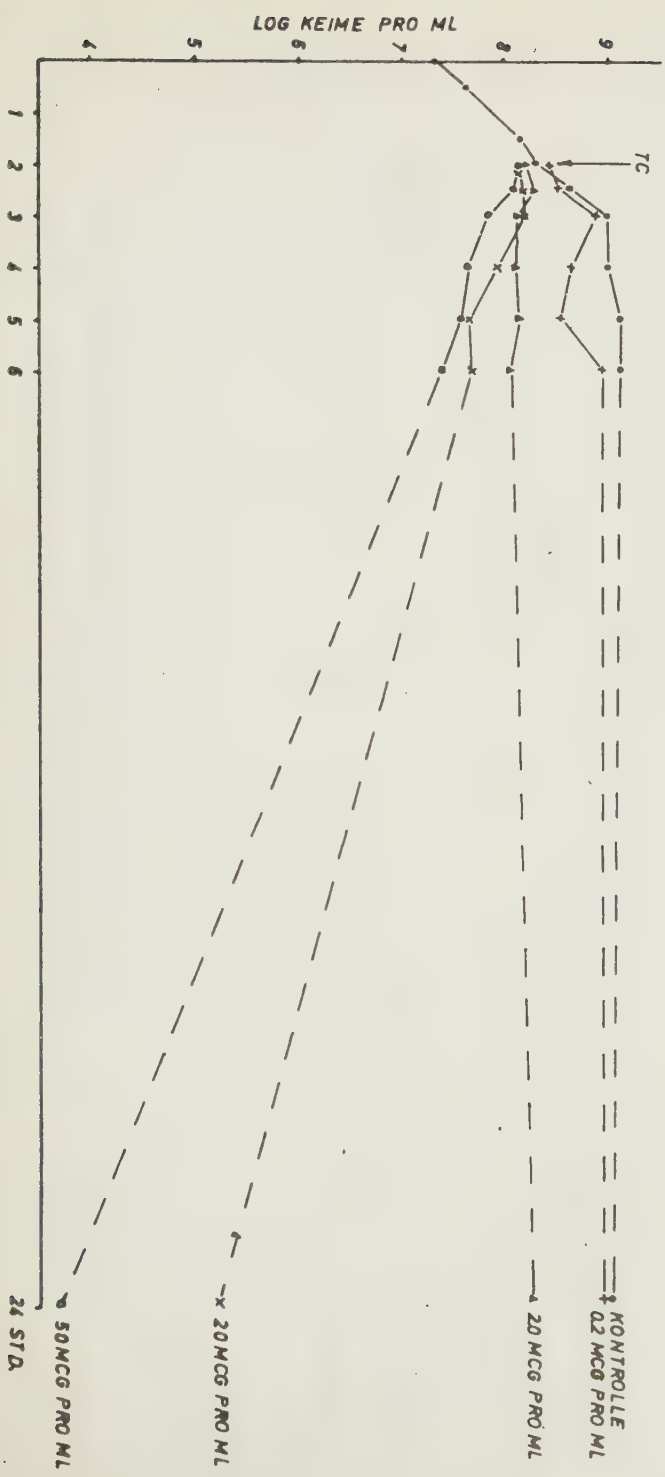


ABB. 20 KEIMZÄHLUNGSKURVEN VON ENTEROCOCCUS BEI HOHER EINSAAT

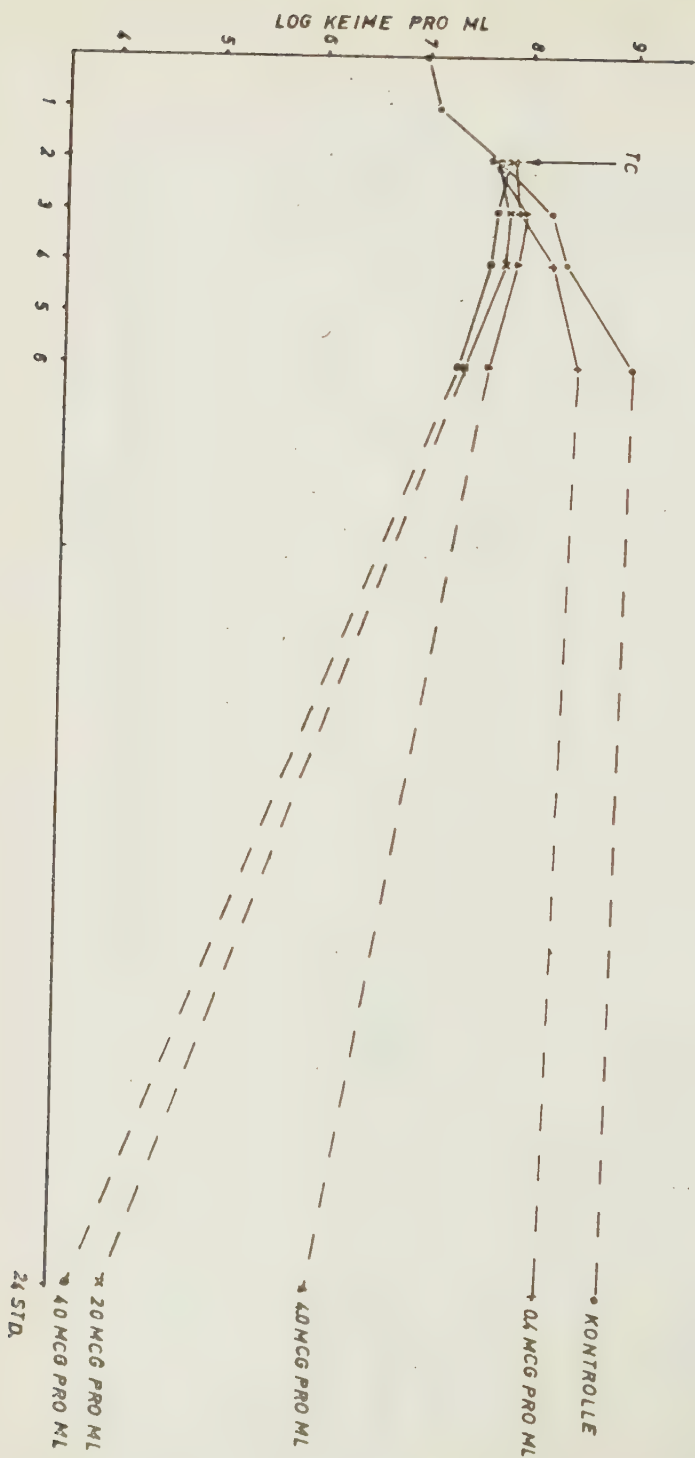
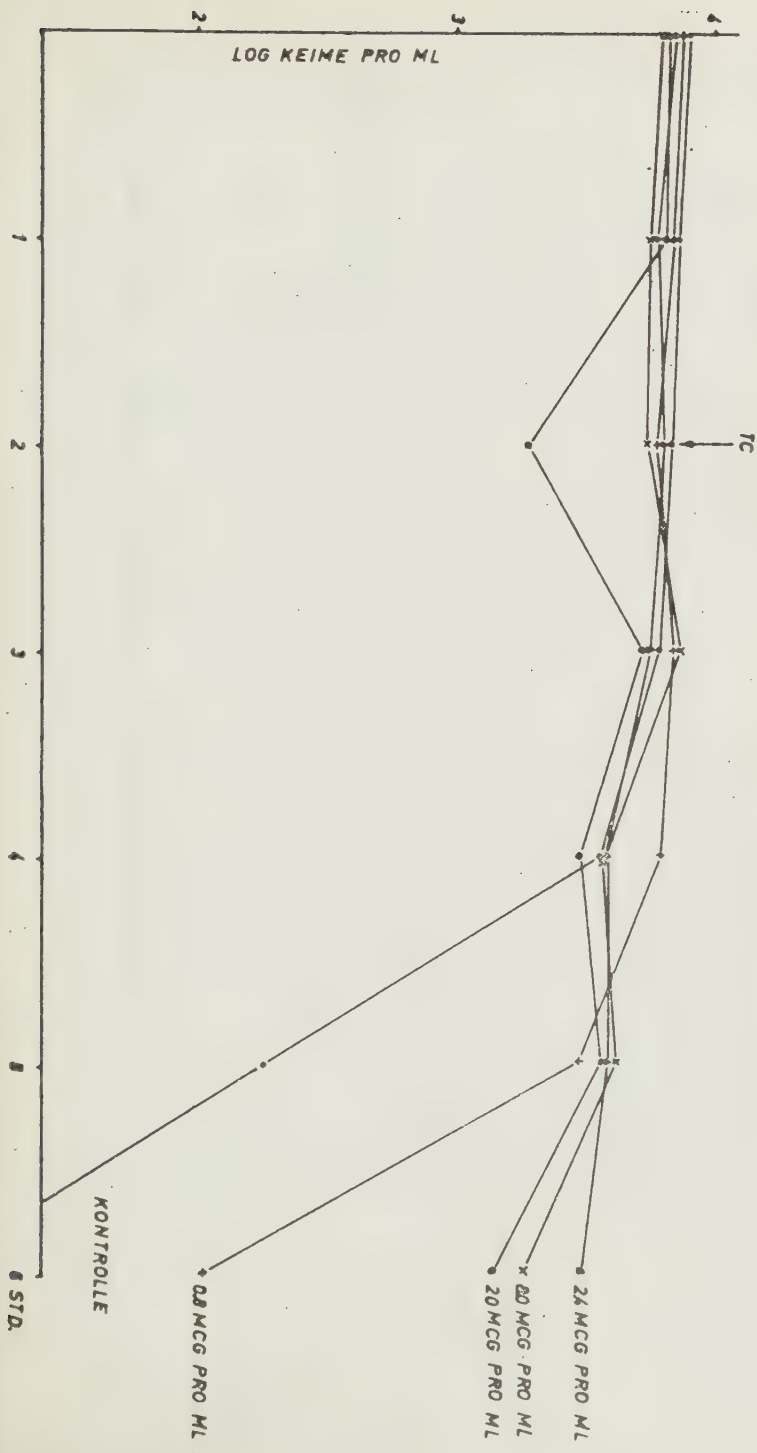


ABB. 3a KEIMZÄHLUNGSKURVEN VON STAPHYLOCOCCUS AUR. HÄM. (RUHENDE KEIME)



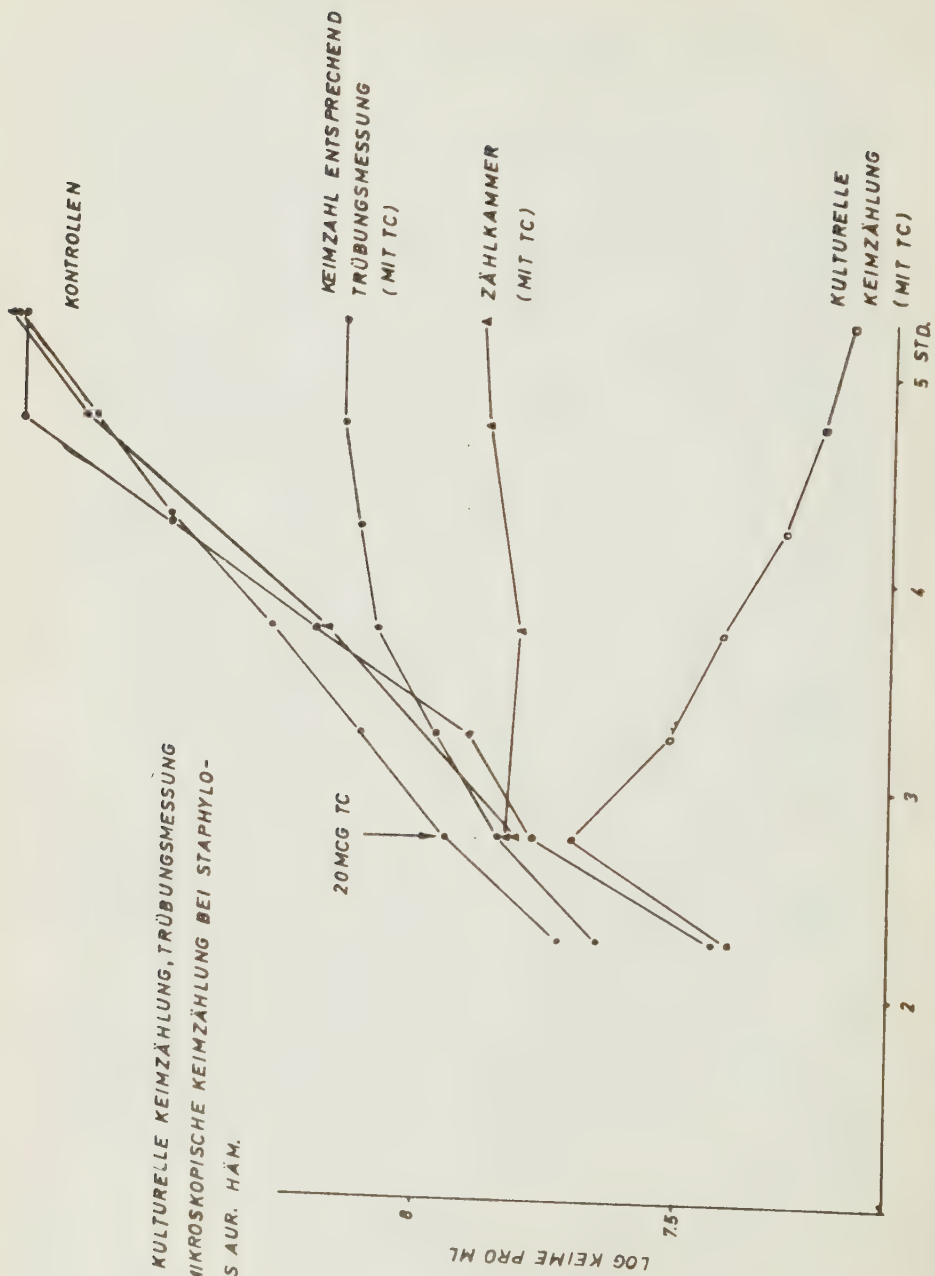
ABR. 3b KEIMZÄHLUNGSKURVEN VON SHIGELLA FLEXNERI (RUHENDE KEIME)



nicht abgetötet sondern im Gegenteil konserviert. TC kann daher kein bakterizider Wirkungstyp zugeordnet werden.

Ein Charakteristikum des degenerativen Wirkungstyps ist es, daß die Vermehrung oder zumindest das Wachstum erst eine gewisse Zeit nach Zugabe des Antibiotikums aufhört. Die kulturellen Keimzählungen ließen jedoch keine fortlaufende Vermehrung nach Zusatz des TC erkennen. Da kulturelle Keimzählungen die Resultante aus Vermehrungs- und Absterbevorgängen sein können, war es erforderlich, sie durch mikroskopische Keimzählungen zu ergänzen. Durch Trübungsmessungen sollten Anhaltspunkte dafür gewonnen werden, ob vielleicht noch Bakterienmasse synthetisiert wird. Mikroskopische Keimzählungen und Trübungsmessungen sind nur mit höheren Bakterienkonzentrationen möglich, die auch höhere TC-Konzentrationen zur Abtötung benötigen. Es wurde daher die Einwirkung von 20mcg/ml TC auf 10^7 /ml proliferierende Keime von *Staphylococcus aureus* hämolyticus Typ SG 511 untersucht. Die Technik der kulturellen Keimzählung war die übliche. Die mikroskopische Zählung wurde in einer Bakterienzählkammer mit Phasenkontrastmikroskop vorgenommen. Es wurden nicht die Bakterienverbände sondern jeder einzelne Kokkus gezählt, nachdem die weitere Vermehrung durch Formalinzusatz unterbunden war. Das Ergebnis zeigt Abb. 4. Es fand sich ein innerhalb der Fehlergrenzen gleichbleibender Wert der mikroskopisch sichtbaren Keime bei gleichzeitiger Verminderung der züchtbaren Keime. Dadurch sind gleichzeitig nebeneinander ablaufende Vermehrungs- und Absterbevorgänge ausgeschlossen. Im Gegensatz zu Penicillin oder Isoniazid hört unter TC die Vermehrung offenbar sofort auf. Die Trübung nimmt aber zunächst weiter zu. Dieses Ergebnis wäre mit der Annahme eines degenerativen Wirkungstypes vereinbar, aber nicht beweisend. Die Trübungszunahme könnte auch durch Quellung mit Wasseraufnahme statt durch echtes Zellwachstum bedingt sein. Dies ließe sich nur durch Trockengewichtsbestimmungen entscheiden,

ABB. 4 KULTURELLE KEIMZÄHLUNG, TRÜBUNGSMESSUNG
UND MIKROSKOPISCHE KEIMZÄHLUNG BEI STAPHYLO-
COCCUS AUR. HÄM.



die aus technischen Gründen nicht möglich waren.

4. Mathematische Bearbeitung der Ergebnisse

4.1 Analyse der Hemmtiterbestimmungen

Für alle untersuchten Bakterienstämme fanden sich niedrige bakteriostatische Hemmtiter. Hinsichtlich der bakteriziden Hemmtiter schälten sich zwei Gruppen heraus: Staphylo -, Entero-, vergrünende Streptokokken und Sporenbildner (außer *B. megaterium*) einerseits und Typhus-, Ruhr-, Klebsiella- und *Dyspepsiecoli*-Bakterien andererseits. Die Gruppenunterschiede der bakteriostatischen Hemmtiter waren gering, aber statistisch signifikant (0,27mcg/ml gegenüber 0,85mcg/ml im Durchschnitt). Die Gruppenunterschiede der bakteriziden Hemmtiter dagegen waren beträchtlich (0,60mcg/ml gegenüber 47,5mcg/ml im Durchschnitt).

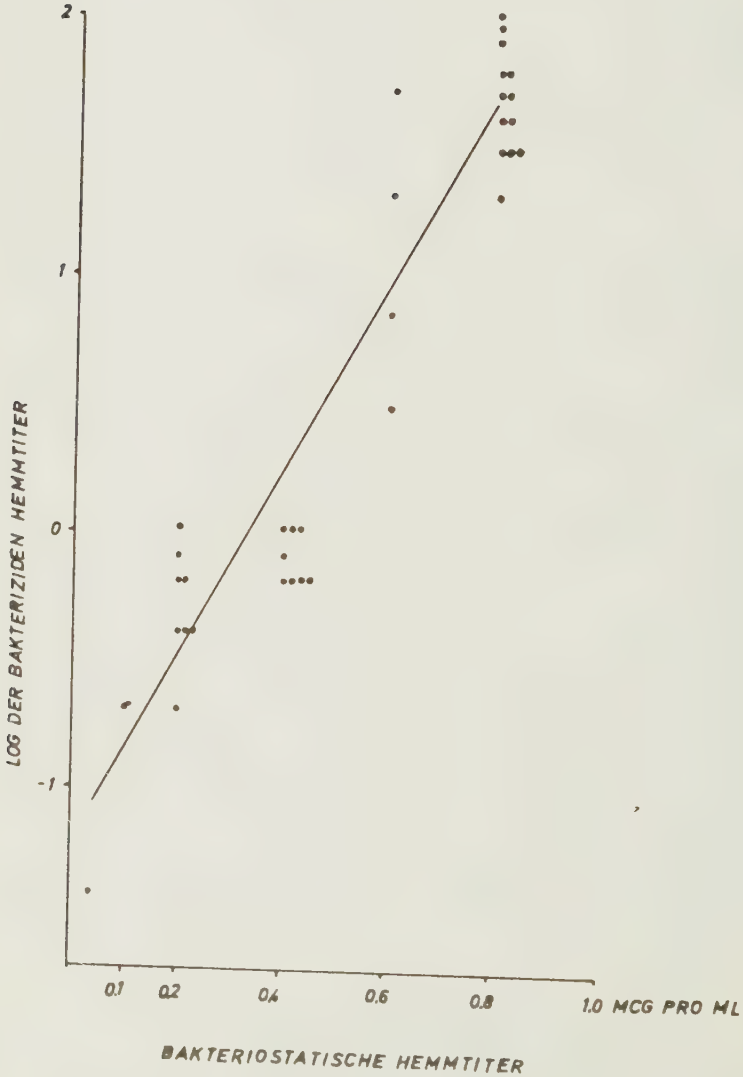
Es ergab sich nun die Frage, ob sich nicht für die Beziehung zwischen bakteriostatischen und bakteriziden Hemmtitern eine generelle Formulierung unabhängig von der Bakterienart finden läßt. In Abb. 5a wurden auf der Abszisse die bakteriostatischen und auf der Ordinate die bakteriziden Hemmtiter bei allen untersuchten Bakterienstämmen aufgetragen. Dabei wurde deutlich, daß ausnahmslos bakteriostatische Hemmtiter unter 0,5mcg/ml mit niedrigen bakteriziden Hemmtitern (im Durchschnitt 0,60mcg/ml) gekoppelt waren. Bakteriostatische Hemmtiter über 0,5mcg/ml zeigten hohe bakterizide Hemmtiter (im Durchschnitt 47,5mcg/ml).

Werden die bakteriziden Hemmtiter auf der Ordinate nicht mehr arithmetisch sondern logarithmisch aufgetragen, so ergab sich eine annähernd lineare Beziehung zum bakteriostatischen Hemmtiter (Abb. 5b). Ob diese tatsächlich als linear betrachtet werden darf, läßt sich nach einem Verfahren prüfen, das bei LINDER²⁴ angegeben ist. Es beruht darauf, daß die Streuung der Einzelwerte um die Gruppenmittelwerte mit der Streuung der Gruppenmittelwerte um die Regressionsgerade durch den F-Test verglichen wird. Sind beide Streuungen nicht unterschiedlich, so liegt Linearität vor. Zur Errechnung der beiden Streuungen wurden die in Tab. III errechneten

ABB. 5a BEZIEHUNG ZWISCHEN BAKTERIOSTATISCHEM UND
BAKTERIZIDEM HEMMTITER



LOGARITHMUS DES BAKTERIZIDEN HEMMTITERS



Tab. III Prüfung der Beziehung zwischen bakteriostatischem (st.HT) und Logarithmus des bakteriziden Hemmtiters (z.HT) auf Linearität.

st.HT = x	z.HT	$\log_{z.HT} y$	y + 2	x^2	$(y + 2)^2$	xy	$\frac{Ty^2}{N_j}$
0,04	0,06	-1,222	0,778	0,0016	0,6053	0,031	0,605
0,1	0,2	-0,699	1,301	0,01	1,6926	0,130	1,693
0,2	0,2	-0,699	1,301		1,6926		
0,2	0,4	-0,398	1,602		2,5664		
0,2	0,4	-0,398	1,602		2,5664		
0,2	0,4	-0,398	1,602		2,5664		
0,2	0,6	-0,222	1,778		3,1613		
0,2	0,6	-0,222	1,778		3,1613		
0,2	0,8	-0,097	1,903		3,6214		
0,2	1,0	0,000	2,000	0,32	4,0000	2,743	23,005
0,4	0,6	-0,222	1,778		3,1613		
0,4	0,6	-0,222	1,778		3,1613		
0,4	0,6	-0,222	1,778		3,1613		
0,4	0,6	-0,222	1,778		3,1613		
0,4	0,8	-0,097	1,903		3,6214		
0,4	1,0	0,000	2,000		4,0000		
0,4	1,0	0,000	2,000		4,0000		
0,4	1,0	0,000	2,000	1,28	4,0000	6,006	28,181
0,6	3,0	0,477	2,477		6,1355		
0,6	7,0	0,845	2,845		6,0940		
0,6	20,0	1,301	3,301		10,8966		
0,6	50,0	1,699	3,699	1,44	13,6826	7,393	37,958
0,8	20,0	1,301	3,301		10,8966		
0,8	30,0	1,477	3,477		12,0895		
0,8	30,0	1,477	3,477		12,0895		
0,8	30,0	1,477	3,477		12,0895		
0,8	40,0	1,602	3,602		12,9744		
0,8	40,0	1,602	3,602		12,9744		
0,8	50,0	1,699	3,699		13,6826		
0,8	50,0	1,699	3,699		13,6826		
0,8	60,0	1,778	3,778		14,2723		
0,8	60,0	1,778	3,778		14,2723		
0,8	80,0	1,903	3,903		15,2334		
0,8	90,0	1,954	3,954		15,6341		
0,8	100,0	2,000	4,000	8,32	16,0000	38,200	175,367
17,74			90,729	11,3716	268,6022	54,473	266,809
= Sx			= Sy	= S(x ²)	= S(y ²)	= Sxy	= S $\frac{Ty^2}{N_j}$

Größen benötigt. Die Streuung der Einzelwerte um die Gruppenmittelwerte ergab sich als Differenz aus der Gesamtstreuung und der Streuung der Mittelwerte der Gruppen um den Gesamt-mittelwert. Die Streuung der Gruppenmittelwerte um die Re-gressionsgerade ergab sich als Differenz aus der Streuung der Gruppenmittelwerte um den Gesamt-mittelwert und der Streuung der Regressionsgerade um den Gesamt-mittelwert. Es entstand folgende Streuungszerlegung:

Art der Streuung	Summe der Abweichungsquadrate	Freiheitsgrade
Regressionsgerade	$\frac{\left(S_{xy} - \frac{S_y S_x}{N}\right)^2}{S(x^2) - \frac{(S_x)^2}{N}} = 30,264$	
Um Regressionsgerade	1,352	$M - 2 = 4$
Zwischen den Spalten	$S \frac{T_j^2}{N_j} - \frac{(S_y)^2}{N} = 31,616$	
Innerhalb d. Spalten	1,793	$N - M = 29$
Gesamtstreuung	$S(y^2) - \frac{(S_y)^2}{N} = 33,409$	

$$F = \frac{1,352 : 4}{1,793 : 29} = 5,452$$

Da $F = 5,452$ kleiner ist als der Tabellenwert von 6,187 bei $P = 0,001$, ist die lineare Regression am Platze. Es ergab sich ein Regressionskoeffizient von

$$b = \frac{S_{xy} - \frac{S_x S_y}{N}}{S(x^2) - \frac{(S_x)^2}{N}} = \frac{8,487}{2,380} = 3,566$$

Die Regressionsgerade folgt der Gleichung

$$\log z.HT = 3,566 \text{ st.HT} - 1,216 \quad (1)$$

Dabei wird unter $z.HT$ der bakterizide und unter $st.HT$ der bakterio-statische Hemmtiter verstanden. Die Beziehung gilt für den Bereich des statischen Hemmtiters zwischen 0,04 und 0,8mcg/ml. Sie könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Bakterien nur einen Rezeptor für die bakterio-statische und die abtötende Wirkung haben. Wenn bei einer Bakterienart schon für die bakterio-statische Wirkung hohe TC-Konzentrationen nötig sind, dann sind erst recht sehr hohe TC-Konzentrationen für die abtötende Wirkung erforderlich. Entsprechend ergeben sich für Bakterienarten, bei denen für eine Bakterio-stase niedrige TC-Konzentrationen nötig sind, auch für eine abtötende Wirkung relativ niedrige TC-Konzentrationen.

4.2 Analyse der Keimzählungskurven

Die Keimzählungskurven zeigen bei niedriger TC-Konzentration eine bakterio-statische, bei hoher TC-Konzentration eine abtötende Wirkung. Es stellte sich nun die Frage, ob auch bei den Keimzählungskurven ein Einfluß der Bakterienart auf die antibakterielle Wirkung festzustellen ist. Für die Hemmtiter hatte sich eine deutliche Abhängigkeit ergeben. So hatten z.B. Staphylokokken wesentlich niedrigere bakterizide Hemmtiter als etwa Typhusbakterien. Die folgenden mathematischen Untersuchungen sollen zeigen, daß auch der Verlauf der Keimzählungskurven durch die Bakterienart beeinflußt wird. Zunächst bestand eine gewisse Schwierigkeit, die antibakterielle Wirkung einer bestimmten TC-Konzentration mathematisch zu erfassen. Jede TC-Konzentration bewirkt eine bestimmte Keimzählungskurve. Bei geringen Konzentrationen findet man eine ansteigende, bei hohen Konzentrationen eine abfallende Kurve. Der Anstieg bzw. Abfall der Kurve bot sich als Maß der antibakteriellen Wirkung an. Er wird mathematisch durch den Regressionskoeffizienten ausgedrückt. Dieser Koeffizient gibt an, um wieviel Einheiten eine Kurve pro Zeiteinheit ansteigt bzw. abfällt. Allerdings ist der Regressionskoeffizient

nur bei Kurven anwendbar, die als Gerade verlaufen. Deshalb mußten unsere Kurven auf Linearität geprüft werden. Es wurde das gleiche Verfahren angewendet wie unter 4.1, daß bei LINDER²⁴ angegeben ist. Tab. IV zeigt die Werte, die für die Prüfung auf Linearität notwendig sind. Es ergab sich ein linearer Verlauf für den größten Teil der Keimzählungskurven in den ersten 4 Std. nach Zugabe des TC. In der letzten Spalte der Tab. IV sind außerdem die Regressionskoeffizienten für die einzelnen Keimzählungskurven angegeben. Diese Regressionskoeffizienten konnten nunmehr als Maß der antibakteriellen Wirkung einer bestimmten TC-Konzentration betrachtet werden.

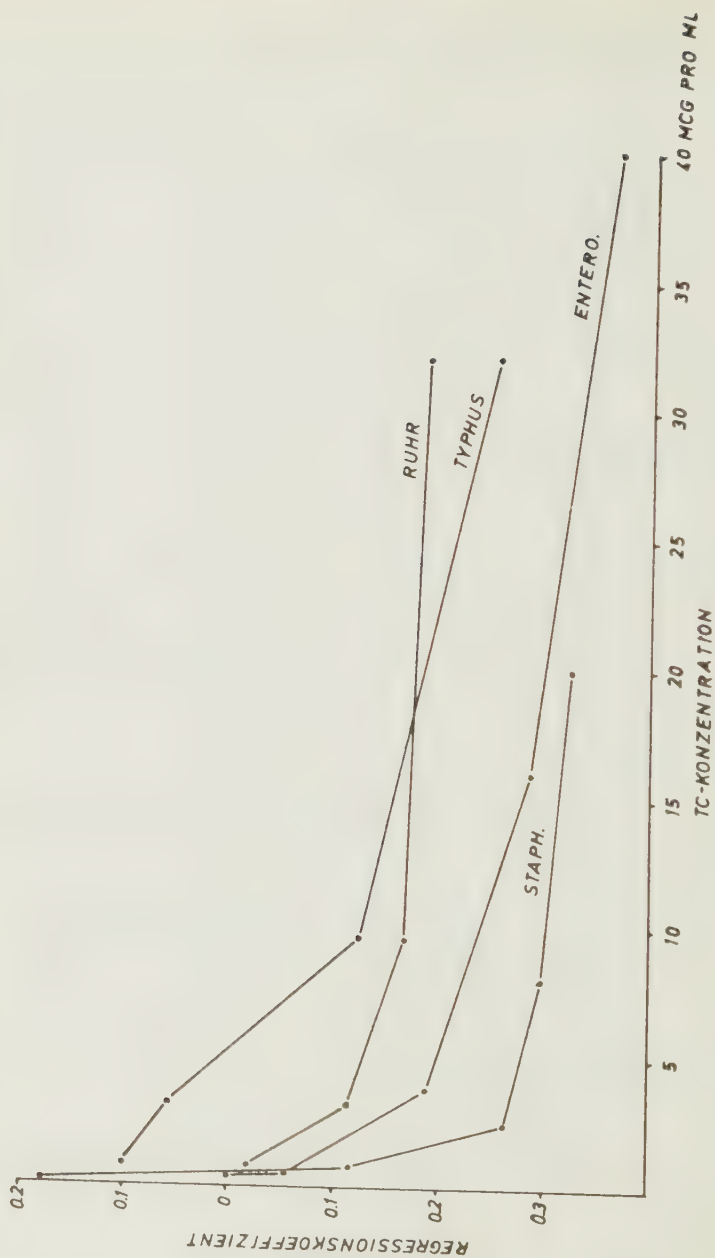
In Abb. 6 sind die Beziehungen dargestellt, die sich zwischen den TC-Konzentrationen und den Regressionskoeffizienten der Keimzählungskurven ergaben. Die Kurven können als Dosis-Wirkungskurven aufgefaßt werden. Die Wirkung des TC, die durch den Regressionskoeffizienten erfaßt wird, wurde auf der Ordinate aufgetragen. Die Dosis des TC wurde auf der Abszisse aufgetragen. Dabei zeigte sich nun, daß die quantitative Auswertung der Keimzählungskurven einen Einfluß der Bakterienart sichtbar macht. Ähnlich den Hemmtiterbestimmungen ergaben sich auch hier zwei Gruppen von Bakterienstämmen: Staphylo- und Enterokokken einerseits und Ruhr- und Typhusbakterien andererseits. Zur Erzielung eines bestimmten antibakteriellen Effektes, d.h. eines bestimmten Regressionskoeffizienten der Keimzählungskurve, waren bei beiden Gruppen unterschiedliche TC-Konzentrationen nötig. Dabei lagen die TC-Konzentrationen bei den Staphylo- und Enterokokken insbesondere im abtötenden Bereich deutlich niedriger als bei Typhus- und Ruhrbakterien. Abb. 6 macht weiter deutlich, daß die negativen Werte der Regressionskoeffizienten bei jeder Bakterienart einem bestimmten Grenzwert zustreben. Eine weitere Erhöhung der TC-Dosis führte nicht mehr zu einer Steigerung der negativen Regressionskoeffizienten. Offensichtlich kann mit dem TC auch in höheren Dosen nur

Tab. IV Prüfung der Keimzahlungskurven auf Linearität

Bakterien- stamm	TC-Konz. in mcg/ml	errechn. F-Wert	Tafelwert für F	P ⁺ Linearität	Regressions- koeffizient
Staphylo- coccus aureus	0,2	11,27	4,37	0,001 ∅	0,181
	0,8	1,81	2,10	0,05 +	- 0,114
	2,4	1,79	2,10	0,05 +	- 0,259
	8,0	2,43	2,82	0,01 +	- 0,301
	20,0	4,63	3,87	0,001 ∅	- 0,324
Entero- coccus	0,4	4,38	4,77	0,01 +	0,002
	0,6	1,89	2,60	0,05 +	- 0,056
	4,8	1,38	2,40	0,05 +	- 0,185
	16,0	2,67	3,23	0,01 +	- 0,285
	20,0	4,07	4,69	0,01 +	- 0,366
Shigella flexneri	0,8	1,16	3,58	0,05 +	0,02
	3,2	14,09	12,86	0,001 ∅	- 0,116
	9,6	1,54	3,58	0,05 +	- 0,169
	32,0	1,25	3,58	0,05 +	- 0,184
Salmonella typhosa	0,8	9,33	12,86	0,001 +	0,107
	3,2	1,89	3,58	0,05 +	0,061
	9,6	12,20	12,86	0,001 +	- 0,127
	32,0	25,53	12,86	0,001 ∅	- 0,256

⁺ = Überschreitungswahrscheinlichkeit

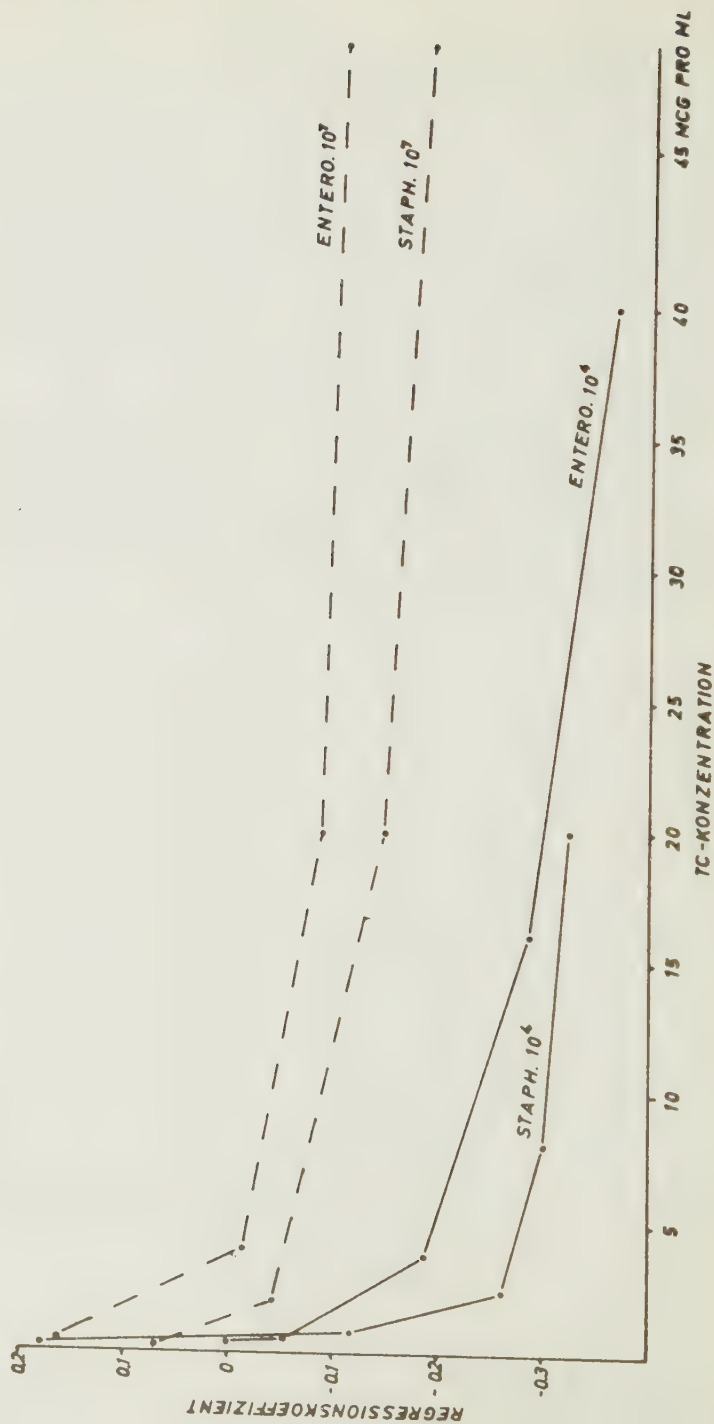
Abb. 6 BEZIEHUNG ZWISCHEN TC-KONZENTRATION UND REGRESSIONSKOEFFIZIENT DER KEIMZÄHLUNGSKURVE



eine bestimmte Absterbegeschwindigkeit der Bakterien erzielt werden. Eine weitere Dosiserhöhung hat keine stärkere Abtötung mehr zur Folge. Auch diese Grenzwerte für die Regressionskoeffizienten zeigten eine Abhängigkeit von der Bakterienart. Bei Staphylo- und Enterokokken konnten mit hohen TC-Konzentrationen Regressionskoeffizienten mit den Werten um - 0,35 erzielt werden. Bei Ruhr- und Typhusbakterien lagen diese Werte um - 0,20. Die abtötende Wirkung des TC ist also bei der ersten Gruppe von Bakterienstämmen viel stärker als bei der zweiten Gruppe. Sowohl die Hemmtiterbestimmungen als auch die Keimzählungskurven dürften dafür als Bestätigung gelten.

Den Einfluß der Einsaat auf die Beziehung zwischen TC-Konzentration und Regressionskoeffizient der Keimzählungskurven zeigt die Abb. 7. Eine Erhöhung der Einsaat auf 10^7 Keime/ml führte zu einer Abflachung der Kurvenverläufe. Die abtötende Wirkung des TC wird also durch eine höhere Einsaat zurückgedrängt.

Abb. 7 BEZIEHUNG ZWISCHEN TC-KONZENTRATION UND REGRESSIONSKOEFFIZIENT DER KEIMZÄHLUNGSKURVE
BEI MITTELGROSSEN UND HOHER EINSAAT



5. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen lassen erkennen, daß die abtötende Wirkung des TC nicht durchgehend von der Form der Bakterienzelle und vom Gramverhalten abhängig ist. So fanden sich unter den Sporenbildern als grampositiven Stäbchen sowohl Arten mit starker (bei *B. cereus*) als auch schwacher abtötender Wirkung des TC (bei *B. megaterium*). Allerdings hatte das TC bei den anderen untersuchten Bakterienstämmen auf die grampositiven Kokken eine starke abtötende Wirkung. Dies wurde kenntlich durch geringe Differenzen zwischen bakteriostatischem und bakterizidem Hemmtiter. Auf die gramnegativen Stäbchen wirkte das TC nur schwach abtötend. Entsprechend bestanden hier starke Unterschiede zwischen bakteriostatischem und bakterizidem Hemmtiter.

Innerhalb einer Bakterienart traten von Stamm zu Stamm keine stärkeren Unterschiede der abtötenden TC-Wirkung hervor. Die abtötende Wirkung des TC ist also artspezifisch.

Die untersuchten Bakterienstämme waren bezüglich der vermehrungshemmenden Wirkung gegen TC gut empfindlich. Es zeigte sich jedoch, daß bakteriostatische Hemmtiter unter 0,5mcg/ml mit niedrigen bakteriziden Hemmtitern gekoppelt sind. Bakterienstämme mit bakteriostatischen Hemmtitern über 0,5mcg/ml hatten hohe bakterizide Hemmtiter. Bei genauer Bestimmung läßt also der bakteriostatische Hemmtiter Rückschlüsse auf die abtötende Wirkung des TC bei einem bestimmten Bakterienstamm zu.

Kennzeichnend für ein Antibiotikum ist sein Wirkungstyp. HIRSCH¹⁵ unterschied erstmals zwischen einem bakteriostatischen bakteriziden und degenerativen Wirkungstyp. Beim bakteriostatischen Wirkungstyp kommt es nach Zusatz des Hemmstoffes bei proliferierenden Keimen nur zu einer Vermehrungshemmung. Die Ausgangskeimzahl wird nicht unterschritten. Beim bakteriziden Wirkungstyp wird bei ruhenden und proliferierenden Keimen die Ausgangskeimzahl unterschritten. Die Absterberate ist konzentrationsabhängig.

Beim degenerativen Wirkungstyp werden ruhende Keime durch den Hemmstoff nicht beeinflusst. Bei proliferierenden Keimen kommt es durch höhere Hemmstoffkonzentrationen zu einer Verminderung der Keimzahl unter die Ausgangskeimzahl. Die Absterberaten sind konzentrationsunabhängig nach Überschreiten eines schmalen Konzentrationsbereiches oberhalb der vermehrungshemmenden Dosis. Nach Zusatz des Hemmstoffes vermehren sich die Keime noch für eine gewisse Zeit oder bauen noch Zellsubstanz auf. Es ergeben sich also 3 Kriterien für den degenerativen Wirkungstyp:

1. Ruhende Keime werden nicht abgetötet.
2. Nach Zusatz des Hemmstoffes fortlaufende, aber quantitativ gestörte Synthese von Zellsubstanz.
3. Weitgehende Konzentrationsunabhängigkeit der Absterberaten.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß TC ruhende Keime nicht antibakteriell beeinflusst.

BARTMANN²³ hat darauf hingewiesen, daß es im Einzelfall sehr schwer sein kann zu entscheiden, ob das 2. Kriterium erfüllt ist. Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, daß nach TC-Zusatz die Trübung zunächst weiter ansteigt. Dies könnte auf ein für eine gewisse Zeit weitergehendes Wachstum hinweisen. Es ist aber nicht beweisend. Die Zahl der mikroskopisch sichtbaren Keime bleibt nach TC-Zusatz konstant. Eine für eine gewisse Zeit weitergehende Vermehrung tritt also nicht auf. Das 3. Kriterium des degenerativen Wirkungstypes ist die Konstanz der Absterberaten nach Überschreiten der bakteriostatischen Dosis. In Abb. 8 sind die diesbezüglichen Unterschiede nochmals herausgestellt. Bei linearem Verlauf der Keimzahlungskurven lassen sich die Beziehungen zwischen den Absterberaten und den TC-Konzentrationen deutlicher in Dosis-Wirkungskurven darstellen. Es ergeben sich für den bakteriziden, bakteriostatischen und degenerativen Wirkungstyp charakteristische Dosis-Wirkungskurven, die in Abb. 9 dargestellt sind.

ABB. 8

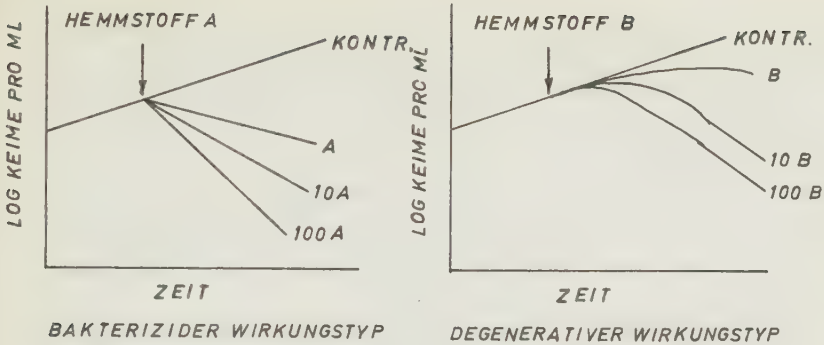
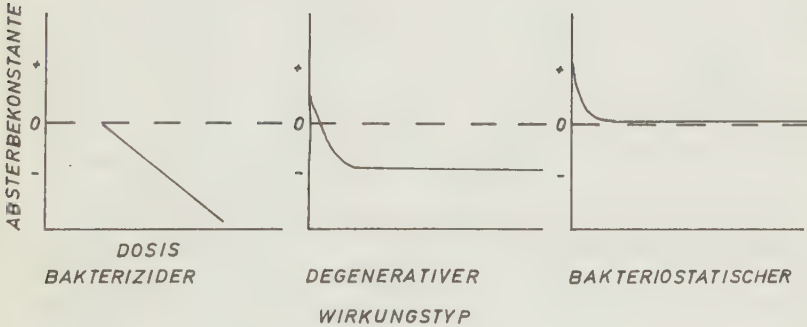


ABB. 9



Ein Vergleich mit Abb. 6 zeigt, daß beim TC Dosis-Wirkungs-Beziehungen vorliegen, die für den degenerativen Wirkungstyp typisch sind. Die Absterberaten sind also beim TC in einem weitem Bereich konzentrationsunabhängig. Dies und die fehlende Wirkung auf ruhende Bakterien lassen beim TC am ehesten an einen degenerativen Wirkungstyp denken. Allerdings ließ sich das 2. Kriterium nicht mit Sicherheit nachweisen.

Verschiedene Autoren haben versucht, aus dem Verlauf der Keimzählungskurven Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus

oder Wirkungsmechanismus zu ziehen.

HIRSCH¹⁵ vertrat die Ansicht, daß beim degenerativen Wirkungstyp unter dem Einfluß des Hemmstoffes die Vermehrung zunächst weitergeht und eine vermehrungsunfähige Tochtergeneration entsteht, die dann sekundär abstirbt.

CHAIN und DUTHIE²⁵ konnten jedoch zeigen, daß nach Zusatz von Penicillin zu proliferierenden Keimen zwar der O₂-Verbrauch vorübergehend ansteigt. Die Zahl der mikroskopisch sichtbaren Keime erhöhte sich aber nicht.

Deshalb sieht BARTMANN²³ das Wesentliche der Degenerations-Hypothese in einer zunächst weitergehenden aber qualitativ gestörten Synthese von Zellmaterial mit oder ohne Vermehrung der Keime.

Die konzentrationsunabhängigen Absterbekurven beim degenerativen Wirkungstyp legen den Gedanken nahe, daß in den Bakterienzellen ein Faktor vorhanden sein muß, der die Wirkung des Hemmstoffes begrenzt. Dabei ergeben sich verschiedene theoretische Möglichkeiten, wo dieser Faktor zu suchen wäre. Er könnte im Bereich der Aufnahme oder im Bereich des Stoffwechsels der Bakterienzelle lokalisiert sein. Wenn jede Bakterienzelle nur eine bestimmte Anzahl Moleküle Hemmstoff aufnehmen kann, dann hat eine Erhöhung der Konzentration keine Erhöhung der Absterberate zur Folge. Andererseits könnte der begrenzende Faktor auch im Bereich des Stoffwechsels liegen. Allen Zellen ist eine Grundausstattung an Enzymen gemeinsam. Da Antibiotika in therapeutischen Dosen Makroorganismen möglichst wenig schädigen sollen, dürfen sie nur solche Stoffwechselreaktionen blockieren, die vorwiegend in den Bakterien anzutreffen sind. Es ist bekannt, daß die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen an Enzymen nach Sättigung mit Substrat konzentrationsunabhängig ist. So wäre die Hypothese möglich, daß die konzentrationsunabhängigen Absterberaten beim degenerativen Wirkungstyp durch Wirkung des Hemmstoffes auf eine oder nur wenige bakterienspezifische, enzymatisch gesteuerte Reaktionen zustande kommen, die hauptsächlich im synthetischen Stoff-

wechsel liegen. Sekundär würde es dann durch Desintegration des gesamten Zellstoffwechsels zum Zelltod kommen. Erhöhte Hemmstoffkonzentrationen könnten die Absterbegeschwindigkeit nicht beeinflussen. Ruhende Keime könnten nicht beeinflusst werden, da bei ihnen kein synthetischer Stoffwechsel stattfindet. Die konzentrationsabhängigen Absterberaten beim bakteriziden Wirkungstyp würden sich dann durch Wirkung des Hemmstoffes auf die Hauptreaktionen des Zellstoffwechsels ergeben, die allen lebenden Zellen gemeinsam sind. Bei höheren Hemmstoffkonzentrationen würden dann immer mehr Stoffwechselreaktionen blockiert. Der Zelltod würde durch unmittelbare Lähmung des Zellstoffwechsels eintreten. Diese rein theoretischen Überlegungen lassen sich mit den Befunden in Einklang bringen, die bisher über den Wirkungsschemismus des TC bekannt geworden sind. So fanden GALE²⁶, HAHN²⁷ u.a. schon bei niedrigen TC-Konzentrationen eine Hemmung der Proteinsynthese. Dieser Teil des Stoffwechsels zeigt eine besonder Abhängigkeit von der Spezies. Fast jedes Lebewesen erzeugt artspezifische Eiweiße. Dabei handelt es sich um eine Kette enzymatischer Reaktionen. Es wäre vorstellbar, daß nach ihrer Blockierung eine Dosiserhöhung des Hemmstoffes keinen stärkeren Effekt hervorrufen kann. Der Stillstand der Proteinsynthese würde sekundär zur Desintegration des gesamten Zellstoffwechsels führen. Befinden sich die Keime in einem Medium ohne Stickstoffquelle, könnte der Hemmstoff nicht zur Wirkung kommen, weil keine Proteinsynthese stattfindet.

Verschiedentlich wurde die antibakterielle Wirkung des TC auf eine besondere Affinität zu Metallionen zurückgeführt, die für den Energiestoffwechsel (insbesondere für den Citronensäurecyclus) nötig sind (ETTINGER²⁸, ALBERT²⁹). Dagegen spricht jedoch der Befund, daß die Nukleinsäuresynthese und die entsprechenden energieverbrauchenden Reaktionen durch TC nicht beeinflusst werden. Auch ist nicht ganz einzusehen, warum bei einer Beeinträchtigung der Citronensäure-

cyclus nicht auch ruhende Bakterien abgetötet werden.

Wenn man also versucht, einen Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Absterbekurven und dem Wirkungsschemismus des TC herzustellen, so dürfte dies am ehesten mit der Annahme einer spezifischen Hemmung der Proteinsynthese möglich sein. Dies schließt jedoch nicht aus, daß die beschriebenen Absterbekurven beim degenerativen Wirkungstyp auch durch andere Wirkungsschemismen entstehen können. So erzeugen die übrigen degenerativ wirksamen Antibiotika (z.B. Penicillin, Streptomycin, INH) zwar ähnliche Absterbekurven. Bisher wird jedoch nur beim Streptomycin eine Hemmung der Proteinsynthese diskutiert²⁷. Das Penicillin scheint dagegen die Zellwandsynthese zu beeinflussen.

BROWN und GARRETT³⁰ fanden bei Untersuchungen über die Einwirkung von TC auf *Escherichia coli* im bakteriostatischen Bereich eine lineare Beziehung zwischen der Absterberate der Keimzählungskurve und der TC-Konzentration. Für den bakteriziden Bereich errechneten sie einen Exponenten von $1/3$. Im bakteriziden Bereich beschreibt also eine Wurzelfunktion die Beziehung zwischen Wirkstoffkonzentration und Absterberate. Wie Abb. 6 zeigt, läßt sich auch bei unseren Versuchen die Beziehung durch eine Wurzelfunktion beschreiben. Unsere Berechnungen nach der von GARRETT angegebenen Methode ergaben jedoch wesentlich niedrigere Exponenten. Sie betragen bei *Staphylococcus aureus* hämolyticus $1/18$, bei *Enterococcus* $1/12$, bei Ruhr $1/11$ und bei Typhus $1/7$.

6. Zusammenfassung

Die antibakterielle Wirkung des TC wird in der Literatur teilweise als bakteriostatisch und teilweise als bakterizid bezeichnet. Diese Unterschiede könnten sowohl methodisch als auch durch Art- und Stammesunterschiede der Bakterien bedingt sein. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die TC-Wirkung auf 38 Bakterienstämme durch Hemmtiterbestimmungen und kulturelle Keimzählungen untersucht.

Um das Problem der Antibiotikaresistenz auszuklammern, wurden nur Bakterienstämme mit guter TC-Empfindlichkeit verwendet. Die bakteriostatischen Hemmtiter lagen im Reihenverdünnungstest im Durchschnitt bei 0,57mcg/ml. Durch Anlegung von Subkulturen wurden die bakteriziden Hemmtiter bestimmt. Dabei ergaben sich zwei Gruppen von Keimen. Bei Staphylo-, Entero- und vergrünenden Streptokokken wurde schon mit niedrigen TC-Konzentrationen (im Durchschnitt 0,60mcg/ml) eine abtötende Wirkung erzielt. Bei Typhus-, Ruhr-, Klebsiella- und Dyspepsiecoli-Bakterien waren höhere TC-Konzentrationen (im Durchschnitt 47,5mcg/ml) nötig. Unterschiedlich war die abtötende Wirkung des TC bei den Sporenbildnern. Die mathematische Auswertung zeigte eine Beziehung zwischen den bakteriostatischen (st.HT) und bakteriziden Hemmtitern (z.HT). Unabhängig von der Bakterienart waren bakteriostatische Hemmtiter unter 0,5mcg/ml mit niedrigen und über 0,5mcg/ml mit hohen bakteriziden Hemmtitern gekoppelt. Die Beziehung läßt sich mathematisch erfassen durch die Gleichung

$$\log z.HT = 3,566 \text{ st.HT} - 1,216.$$

Die Keimzählungskurven zeigten nach mittelgroßer Einsaat proliferierender Keime bei niedriger TC-Konzentration eine vermehrungshemmende, bei hoher TC-Konzentration eine abtötende Wirkung. Die mathematische Interpretation der Absterbekurven ließ auch hier einen Einfluß der Bakterienart erkennen. Bei Staphylo- und Enterokokken war die abtötende Wirkung des TC wesentlich ausgeprägter als bei Typhus- und

Ruhrbakterien. Eine Erhöhung der Einsaat auf 10^7 Keime/ml hatte eine Abschwächung der abtötenden Wirkung des TC zur Folge. Ruhende Keime werden durch TC nicht antibakteriell beeinflusst. TC verzögerte sogar das natürliche Absterben der Keime.

Hemmtiterbestimmungen und kulturelle Keimzählungen haben gezeigt, daß die Bakterienart von Einfluß auf die abtötende Wirkung des TC ist.

Das TC läßt sich den bisher bekannten Wirkungstypen nicht sicher zuordnen. Am nächsten dürfte es dem degenerativen Wirkungstyp stehen, da es nur auf proliferierende und nicht auf ruhende Keime abtötend wirkt und da die Absterbegeschwindigkeit in einem großen Wirkungsbereich konzentrationsunabhängig ist. Allerdings hört bei höheren TC-Konzentrationen die Vermehrung der Keime sofort nach Zugabe des TC auf, was bei den bisher bekannten degenerativ wirkenden Substanzen nicht beobachtet wurde.

Literatur

1. WALTER, A.M., L. HEILMEYER: Antibiotica-Fibel, Georg Thieme-Verlag Stuttgart (1965)
2. KUSCHINSKY, G., H. LÜLLMANN: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie Georg Thieme-Verlag Stuttgart (1964)
3. HAUSCHILD, F.: Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie, VEB Georg Thieme-Verlag Leipzig (1960)
4. HOBBY, G.L., T.F. LENERT, D. PIKULA, M. KISELUK and M.E. HUDDERS: Ann. N.Y. Acad. Sci. 53 (1950), 266-276
5. KLEIN, P.: Klin. Wschr. 45/46, 1087-1091 (1953)
6. BOOTHE, J.H., MORTON, J., PETISI, J.P., WILKINSON, R.G., WILLIAMS, J.H.: J Amer. chem. Soc. 75 (1953), 4621
7. CONOVER, L.H., MORELAND, W.T., ENGLISH, A.R., STEPHENS, C.R., PILGRIM, F.J.: J. Amer. chem. Soc. 75 (1953) 4622
8. MINIERI, P.P., FIRMIN, M.C., MISTRETTA, A.G., ABBY, A., BRICKER, C.E., RIGLER, N.E., SOKOL, H.: Antibiotics Annual 1953-54, 81
9. WELCH, H., W.A. RANDALL, R.J. REEDY and E.J. OSWALD: Antibiotics and Chemotherapie 4 (1954), 741
10. REEDY, R.J., W.A. RANDALL and H. WELCH: Antibiotics and Chemotherapie 5, 115 (1955)
11. HAMBURGER, M. and J. CARLETON: J. Lab. clin. Med. 49, (1957), 276-281
12. HAMBURGER, M., J. CARLETON: Arch. intern Med. 105, 372-382 (1960)
13. KNOTHE, H., J. MAHLER: Dtsch. med. Wschr. 1687 (1959)
14. RITZERFELD, W.: Klin. Wschr. 38 (1960), 698-703
15. HIRSCH, J.: C.R. Annl Soc. Turque Sci. phys. Nat. 12 (1945), 1
16. MAAS, E.A., M.J. JOHNSON: J. Bacteriol. 47 (1949), 415 und 48 (1949), 361
17. ROWLEY, D., P.D. COOPER, P.W. ROBERTS, E. LESTER SMITH: Biochem. J. 46 (1950) 157
18. COOPER, P.D.: J. gen. Microbiol. 13 (1955), 22 und J. gen. Microbiol. 10(1954), 236

19. PARK, J.T., M.J. JOHNSON: J.biol. Chem. 179 (1949), 585
20. PARK, J.T.: J. biol. Chem 194 (1952), 877
21. PARK, J.T., J.L. STROMINGER: Science 125 (1957), 99
22. MITCHISON, D.A., J.B. SELKON: Amer. Rev. Tuberc. 74 (1956), Suppl., 109
23. BARTMANN, K.: Isoniazid-Möglichkeiten und Grenzen seiner Wirkung Georg Thieme-Verlag Stuttgart (1963)
24. LINDER, A.: Statistische Methoden, Verlag Birkhäuser Basel 3. Aufl. (1961)
25. CHAIN, E. und E.S. DUTHIE: Lancet 1 (1945), 652
26. GALE, E.F., J.P. FOLKES: Biochem. J. 53 (1953), 493
27. HAHN, F.E.: III. International Congress of Chemotherapy vol. 1 p. 215, Georg Thieme-Verlag Stuttgart (1964)
28. ETTLINGER, L.: Antibiotics Chemoth. 4 (1957), 46
29. ALBERT, A.: Nature (London) 172 (1953), 201
30. BROWN, M.R.W., E.R. GARRETT: J. pharm. Sci. (1964), 179-183

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank Herrn Professor Dr. K. Bartmann aussprechen. Er hat durch viele Ratschläge zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Er war immer bereit, seine Zeit für Diskussionen zu opfern. Für meine Arbeit im Zentrallabor der Städtischen Klinik für Lungenkranke in Heckeshorn habe ich nahezu ideale Arbeitsbedingungen vorgefunden. Ich wünsche jedem Doktoranden einen solchen Doktorvater!

Lebenslauf

Am 5. Oktober 1939 wurde ich in Coswig Bez. Dresden als Sohn des Maschinenbauermeisters Heinz Oertel und seiner Ehefrau Dorle Oertel geb. Schmidt geboren. Ich besuchte von 1945 bis 1953 die Grundschule in Coswig. Von 1953 bis 1957 war ich Schüler der Oberschule in Meißen. Dort bestand ich das Abitur. 1957 begann ich mein Medizinstudium an der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin. Nach 2 1/2 Jahren legte ich das Physikum ab. Ich studierte dann ein Semester an der Medizinischen Akademie in Dresden. 1960 setzte ich mein Studium an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin fort. Hier habe ich 1963 das medizinische Staatsexamen mit der Note "gut" bestanden. Die Medizinalassistentenzeit verbrachte ich in Berlin im Jüdischen Krankenhaus, im Städtischen Krankenhaus Spandau, im Humboldt-Krankenhaus und im Waldkrankenhaus Spandau. Außerdem war ich 1/2 Jahr im Zentrallabor der Städtischen Klinik für Lungenkranke in Heckeshorn tätig. Während dieser Zeit habe ich die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz.Dr. Bartmann durchgeführt. Ende 1965 erhielt ich die Approbation als Arzt. Seit Anfang 1966 bin ich als Stationsarzt auf der inneren Abteilung des St. Hildegard-Krankenhaus tätig.

Joachim Oertel

